

УДК 536.82

С.И. ЛОСЬ

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
01001 Киев, ул. Терещенковская, 2, Украина

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФИКОЭРИТРИНА ИЗ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ

Разработаны биохимические основы получения пищевого красителя – фикоэритрина из морской водоросли грацилярии. Определены оптимальные условия разрушения водорослей и экстрагирования красителя (состав экстрагента, его концентрация, pH, температура и время обработки). Даны общие рекомендации для создания опытно-экспериментального производства. Апробирован и рекомендован способ разрушения биомассы морских красных водорослей, в основу которого положен принцип механического разрушения клеточной стенки водорослей, сочетающий замораживание экстрагента с гомогенизацией водорослей. Для получения и предварительной очистки экстракта фикоэритрина рекомендована последовательная фильтрация и центрифугирование разрушенной биомассы водорослей и экстракта фикоэритрина. Для доочистки и концентрирования экстракта предложена мембранная фильтрация и осаждение 45-50 %-м водным раствором этилового спирта или ацетона. Предлагаемый способ производства пищевого красителя из грацилярии позволяет получать чистый фикоэритрин интенсивного красно-малинового цвета, который может быть широко использован в пищевой и парфюмерной промышленности в качестве пищевых добавок, красителей, а также в медицинской промышленности как флуоресцентные метчики для диагностики и в радиобиологии.

Ключевые слова: морские водоросли, грацилярия, фикоэритрин, пищевой краситель, технология.

Введение

В последнее время возрос интерес к использованию нетрадиционных источников сырья для получения натуральных красителей, поскольку многие синтетические красители токсичны. К таким перспективным пищевым красителям можно отнести фикоэритрин морских красных водорослей. Этот совершенно не токсичный красный пигмент имеет белковую природу и ярко выраженную оранжевую флуоресценцию, его можно использовать в пищевой, парфюмерной и медицинской промышленности (Micro-algae ..., 1988, Суховерхов и др., 2002).

Известные зарубежные фирмы ежегодно тоннами продают эти красители в основном для кондитерской и парфюмерной промышленности. В США запатентовано их применение в качестве флуоресцентных метчиков для иммунодиагностики (Stryer Zybert et al., 1989). Имеются также сведения об использовании фикоэритрина и родственного ему синего пигмента фикоцианина в онкологии и как радиопротектора (Hirata Takashi et al., 2000; Bhat Vadiraja, Madyastha, 2001; Romay Cheyla et al., 2001).

© С.И. Лось, 2008

Биохимической особенностью красных водорослей является преобладание в составе пигментного аппарата красного фикобилинового пигмента – фикоэритрина.

Морские красные водоросли, такие как анфельция, филофора, грацилярия, лауренция, гелидиум и др., являются перспективными объектами для получения этого красителя. Однако в Черном море нет значительных скоплений этих агароносных водорослей, поэтому целесообразно их выращивать в марикультуре на морских плантациях. Грацилярию, например, для получения фикоэритрина, высококачественного агара, аминокислот, витаминов и т.д. можно выращивать практически в неограниченном количестве (Евстигнеева, 1993; Судьина и др., 1994; Беляев, Нехорошев, 2002).

Известна высокая лабильность фикобилиновых пигментов. Количество и различные структурные вариации этих пигментов зависят от вида водоросли и ее возраста, условий произрастания, сезонности, питания, хроматической адаптации, температурного режима и т.д. (Pegom et al., 1989, Бойченко и др., 1990; Лось, 1995).

На сегодняшний день нет достаточно надежного и простого метода выделения и очистки фикоэритрина. Ограниченное количество патентов технологических разработок получения пищевых красителей из водорослей, которые в основном касаются синего фикоцианина из синезеленых водорослей, грешат сложностью технологии, а также значительными затратами времени и средств.

Создание рационального технологического процесса должно базироваться на детальном знании структуры и свойств пигментов, белков, жизнедеятельности гидробионтов.

Цель данной работы – разработать биохимические основы технологии производства фикоэритрина как пищевого красителя из морских водорослей: исследовать режим измельчения водорослей, экстрагирования из них красного пигмента, подобрать экстрагент, температуру и время обработки, определить поэтапную очистку раствора красителя.

Материалы и методы

Объектом исследования была *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf., которая относится к отделу красных водорослей – *Rhodophyta*, классу *Florideophyceae*, порядку *Gigartinales* Schwitz, сем. *Gracilariaceae* (Näg.) J. Ag., роду *Gracilaria* Grév.

Gracilaria verrucosa была собрана в Черном море вблизи Севастополя.

Водоросли очищали от механических примесей, промывали и высушивали до воздушно-сухого состояния.

Отмытые сырые водоросли измельчали до пастообразной массы в экспериментальной дробилке, сконструированной в Республиканском научно-технологическом центре по проблемам производства пищевых продуктов.

Извлечение пигмента из водорослей осуществляли двукратной экстракцией натрий-фосфатным буфером (рН 6,5-7,5, молярность 0,02-0,05 М), который предварительно замораживали в чешуйчатый лед. Спектральные измерения проводили на спектрофотометре UV-VIS.

Экстракцию фикоэритрина из водорослей производили в широком диапазоне температур, которую поддерживали в термостате.

Первичное разделение экстракта и компонентов разрушенной биомассы осуществляли с помощью центрифугирования на центрифуге ЦЛН-2, очистку и концентрирование раствора фикоэритрина – методом мембранной фильтрации на мембране УАМ-500 при давлении 0,5 МПа. Оптическую плотность раствора пигмента измеряли на спектрофотометре СФ-46.

Для лабораторного исследования фикоэритрин извлекали из водорослей путем их растирания в ступке с кварцевым песком в 0,02М натрий-фосфатном буфере при рН 7.

При изучении влияния кислотности среды на пигмент использовали цитратно-фосфатный буфер (рН 2,5-8,9) и буфер 0,05М Na_2HPO_4 – 0,05М NaOH (рН 9-12,5). Спектры поглощения фикоэритрина измеряли в пределах рН 2,5-11 после 1 ч экспозиции в среде определенной кислотности.

Результаты обрабатывали статистически, стандартные отклонения не превышали 5 %.

Результаты и обсуждение

1. Влияние степени разрушения клеточной стенки водорослей на выход красителя

Исключительно важным для экстрагирования пигмента является разрушение клеточной стенки водорослей. В основе всех известных способов извлечения пигментов из морских макрофитов, отличающихся высокой прочностью клеточной стенки, лежит механическое разрушение клетки. Мы исследовали влияние различных физико-химических факторов на экстракцию фикоэритрина. Предстояло установить степень измельчения водорослей, величину кислотности и концентрацию экстрагента, замораживание и оттаивание водорослей. Результаты опытов приведены в табл. 1. Установлено, что экстракция пигмента не происходит при измельчении водорослей до 2-3 мм и настаивании измельченной массы в течение суток; при помощи гидроудара можно извлечь примерно 20 % общего количества пигмента; замораживание и оттаивание водорослей без их измельчения не приводило к желаемому результату; экстрагирование эффективнее проходило при рН экстрагента, близкому к нейтральному. Максимальное извлечение пигмента было достигнуто при растирании предварительно замороженных водорослей до пастообразного состояния (10-15 мкм) в 0,05 М натрий-фосфатном буфере при рН 7.

Таблица 1. Экстракция фикоэритрина из *Gracilaria verrucosa* в зависимости от условий обработки биомассы водоросли

| Способ измельчения водоросли | Размер водоросли | Экстрагент | рН раствора | Время экстракции, ч | Количество экстрагированного фикоэритрина | |
|--|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------|---|----------------|
| | | | | | мг/г сух. биомассы | % макс. выхода |
| Механический | 2-3 мм | Вода | 5,5 | 24 | - | - |
| Гидроудар | 2-3 мм | Вода | 5,5 | 1 | 0,98 | 20,94 |
| | | | | 24 | 1,00 | 21,36 |
| Растирание до пастообразного состояния | 10-15 мкм | Вода | 5,5 | 14 | 3,86 | 82,47 |
| Растирание до пастообразного состояния, замораживание | 10-15 мкм | Вода | 7,0 | 1 | 4,34 | 92,73 |
| | | | | | 4,52 | 96,58 |
| Замораживание биомассы, растирание до пастообразного состояния | 10-15 мкм | Буфер 0,05 М натрий-фосфатный | 7,0 | 1 | 4,68 | 100,0 |

Ранее нами была исследована возможность использования таких ферментов, как целлюлаза, пектоаваморин, 1 %-й пепсин. Последний способствовал 100 %-й экстракции пигмента без растирания водорослей, однако он вызывал отщепление хромофорной группы, что приводило к изменению физико-химических свойств пигмента.

Из всех вышеупомянутых способов разрушения клеточной стенки водорослей для более полного извлечения пигмента мы остановились на механическом способе, как наиболее простом, легкодоступном, дешевом и не нарушающем свойств красителя.

Нами апробирован способ разрушения морских красных водорослей, включающий замораживание экстрагента в чешуйчатый лед с гомогенизацией водорослей. Водоросли отмывали от механических примесей, загружали в дробилку, добавляли замороженный в чешуйчатый лед экстрагент, измельчали смесь до пастообразной массы в течение 5-10 мин. Производительность дробилки 300 кг водорослей в 1 ч.

2. Влияние природы экстрагента, его концентрации, уровня кислотности на производительность красителя

Поскольку фикоэритрин представляет собой водорастворимый пигмент, мы использовали в качестве экстрагента воду и фосфатный буфер.

Оказалось, что экстракция фикоэритрина эффективнее проходит в фосфатном буфере, чем в воде (см. табл. 1). Здесь важную роль играет ион

фосфора, а также более высокий уровень pH буфера (6,5-7,5) по сравнению с дистиллированной водой (pH 5-6).

Как известно (Hattori et al., 1965; Mac Coll et al., 1981; Lu et al., 1984), спектры поглощения фикобилиновых пигментов существенно зависят от их структурной организации, которая определяется степенью агрегации-диссоциации белковой части молекулы (Scott, Berns, 1965).

Спектральный анализ является наиболее достоверным показателем состояния пигментов. Исследование спектральных показателей мы проводили при одной и той же концентрации фикобилипротеинов, равной единице оптической плотности гомогената.

Фикоэритрин красной водоросли *Gracilaria verrucosa* имеет три максимума поглощения – при 498-499, 540-545 и 565-566 нм, положение которых сохраняется независимо от кислотности раствора (рис. 1, табл. 2).

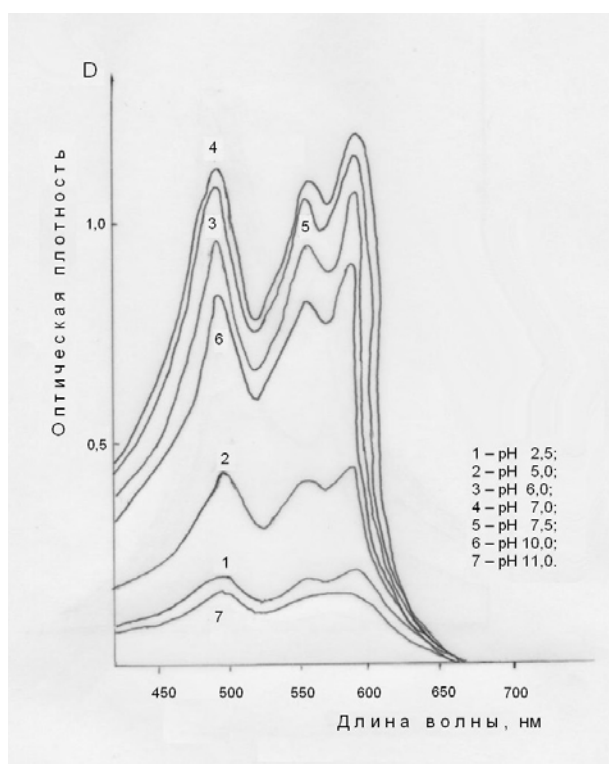


Рис. 1. Спектры поглощения растворов фикоэритрина из грацилярии при различных pH

Наибольшая интенсивность поглощения обнаружена при pH 7,5, которая составляет 96-100 % максимальной. С увеличением кислотности или щелочности среды оптическая плотность пигмента снижается. Исследование влияния pH на спектр поглощения фикоэритрина показало высокую стойкость структуры этого пигмента в пределах pH 3-10. Как в сильно кислой (pH 2,5), так и в сильно щелочной среде (pH 11) наблюдается резкое снижение максимума поглощения

фикоэритрина, соответственно, до 18 и 15 %, а также изменяется характер кривой поглощения. При этом резко снижается качество и внешний вид пигмента, поскольку происходит коагуляция белка и обесцвечивание пигмента, его помутнение и выпадение в осадок (см. рис. 1).

Таблица 2. Зависимость оптической плотности растворов фикоэритрина от pH среды

| pH | Интенсивность поглощения фикоэритрина (% макс.) |
|------|---|
| 2,5 | 18,3 |
| 5,0 | 38,3 |
| 6,0 | 88,3 |
| 6,5 | 97,4 |
| 7,0 | 100 |
| 7,5 | 96,6 |
| 8,0 | 89,2 |
| 10,0 | 75,0 |
| 11,0 | 15,0 |

Таблица 3. Экстракция фикоэритрина натрий-фосфатными буферами разной молярности

| Молярность буфера, М | Содержание фикоэритрина, мг/г сух. массы (по экстинции) |
|----------------------|---|
| 0,02 | 4,59 |
| 0,05 | 4,68 |
| 0,10 | 3,93 |

Разные показатели снижения оптической плотности фикоэритрина в растворах с определенным значением pH могут свидетельствовать о кооперативном характере спектральных изменений, обусловленных диссоциацией этих белков на субъединицы. Обнаруженное нами резкое изменение спектральных показателей при крайних значениях pH среды также свидетельствует о дезагрегации фикобилинового пигмента.

Исследование зависимости оптической плотности растворов фикоэритрина от pH среды показало, что в области pH 6,5-7,5 интенсивность поглощения максимальная, т.е. пигмент обладает наиболее ярким и глубоким цветом.

Для экстракции пигмента мы рекомендуем использовать буфер с молярностью 0,02-0,05 М. Как видно из табл. 3, наибольшая экстракция красителя достигается фосфатным буфером с 0,02-0,05 М.

3. Влияние температуры и времени экстрагирования на выход фикоэритрина

Прогревание гомогената до 50 °С в течение 1 ч приводит к отщеплению фикобилосом от фотосистемы 11, что способствует более полному экстрагированию пигмента (Nattori et al., 1965). Действие температурного фактора на фикоэритрин мы изучали в пределах 20-80 °С при каждом повышении температуры на 10 °С при одной и той же величине рН экстракта (рН 7). Раствор нагревали в течение 10 мин, быстро охлаждали в воде до комнатной температуры (около 5 мин) и проводили спектральные измерения на спектрофотометре UV-VIS. Результаты опытов показали, что оптическая плотность растворов фикоэритрина, а следовательно, экстракция и сохранность нативной структуры пигмента максимальная (93-100 %) при температурах 20-50 °С (рис. 2, табл. 4). При температуре ниже 20 °С экстракция красителя замедляется.

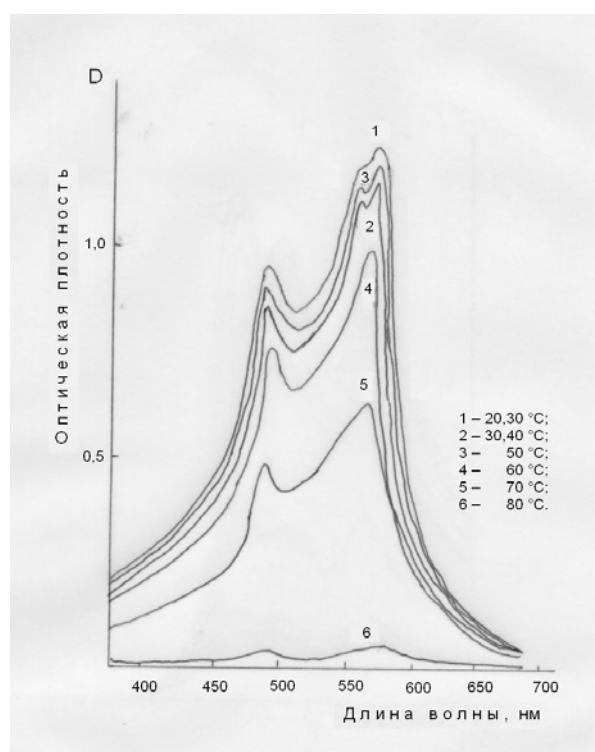


Рис. 2. Спектры поглощения растворов фикоэритрина из грацилярии при различной температуре

Увеличение температуры экстракции выше 50 °С приводит к необратимой коагуляции белковой части молекулы фикоэритрина, резкому падению интенсивности и глубины окраски красителя, его помутнению, выпадению в осадок и обесцвечиванию при температуре 80 °С (рис. 3).

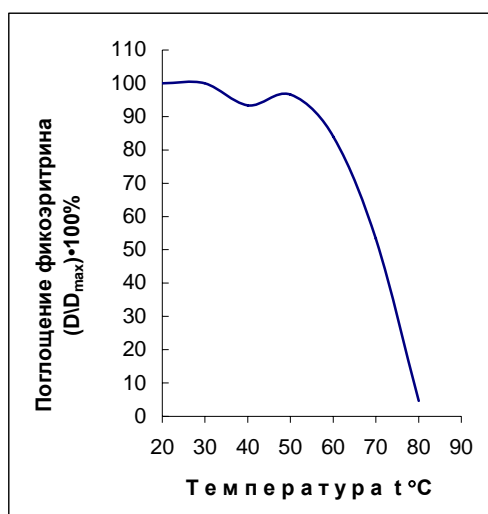


Рис. 3. Влияние температуры на поглощение фикоэритрина

Установлено, что концентрация пигмента в растворе зависит от времени экстрагирования. Через 2 ч экспозиции выход фикоэритрина составляет лишь 11 %, достигая максимума через 24 ч (табл. 5).

Выдерживание биомассы в течение двух суток незначительно влияло на выход пигмента (0,6 %).

Таблица 4. Зависимость оптической плотности растворов фикоэритрина от температуры

| Температура, °С | Экстинция главного максимума поглощения фикоэритрина (% макс.) |
|-----------------|--|
| 20, 30 | 100,0 |
| 40 | 93,5 |
| 50 | 96,7 |
| 60 | 83,0 |
| 70 | 51,6 |
| 80 | 4,8 |

Таблица 5. Влияние продолжительности экстракции на выход красителя

| Продолжительность экстракции, ч | Концентрация фикоэритрина (г/кг сухого сырья) | Выход красителя (% экстракции в сут) |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|
| 2 | 1,36 | 10,92 |
| 3 | 4,02 | 32,28 |
| 4 | 4,90 | 39,35 |
| 24 | 12,45 | 100,0 |
| 48 | 12,52 | 100,6 |

4. Первичная очистка экстракта фикоэритрина

Для получения раствора чистого фикоэритрина были подобраны условия первичной очистки экстракта водорастворимых веществ из водорослей. Для

первичного разделения экстракта и компонентов разрушенной биомассы нами предложена последовательная фильтрация под низким давлением и (или) центрифугирование при 1500-5000 g в течение 15-20 мин. В результате получился прозрачный раствор, содержащий фикоэритрин, однако такой экстракт еще содержал значительное количество хлорофилл-белковых комплексов, каротиноидов, полярных липидов, низкомолекулярных белков и т.д., которые маскируют цвет красного пигмента.

Основную часть примесей можно удалить при помощи очистки и концентрирования раствора фикоэритрина методом мембранной фильтрации. Как дополнительную к предыдущим операциям первичной очистки красителя мы предлагаем концентрирование и дальнейшую очистку пигмента химическим путем.

Проведенная нами поэтапная очистка и осаждение фикоэритрина из раствора сульфатом аммония различной концентрации и полиэтиленгликоля довольно эффективна, однако требует продолжительного времени, неоднократного центрифугирования, а в случае очистки сульфатом аммония – проведения дополнительного диализа или колоночной хроматографии на G-200 для удаления солей.

Высокая эффективность была достигнута при очистке фикоэритрина водным раствором спирта или ацетона. Рекомендуем проводить осаждение фикоэритрина 45-50 %-м водным раствором этилового спирта с добавлением 1 %-го хлористого натрия. Это позволит в считанные минуты (2-5 мин) осадить фикоэритрин, очистив его от всех примесей. Во время такой обработки не происходит денатурация белковой части молекулы фикоэритрина (до 30 мин).

Аналогичный эффект достигается при воздействии 45 %-го ацетона на раствор фикоэритрина. Установлено, что в ацетоне пигмент может сохраняться без изменения в течение нескольких суток.

Осажденный таким способом пигмент рекомендуем отделять центрифугированием при 3500-6000 g в течение 10 мин, а чистый плотный осадок высушивать.

Таким образом, технология получения пищевого красителя (фикоэритрина) из морских водорослей состоит из четырех этапов:

- 1 – разрушение водорослей;
- 2 – экстрагирование пигментов клетки, в т.ч. фикоэритрина;
- 3 – последовательная очистка раствора фикоэритрина;
- 4 – концентрирование раствора и характеристика получаемого препарата красителя.

Получение пигмента из водорослей осуществляется следующим образом: после отмывки водорослей от механических примесей сырье загружается в дробилку, в которую подается замороженный в чешуйчатый лед экстрагент, и производится измельчение до пастообразной массы в течение 5-10 мин.

В связи с неблагоприятной экологической обстановкой в настоящее время весьма актуальна проблема чистоты сырья. С целью его очистки мы предлагаем вводить в воду для отмывания водорослей и в экстрагент NaЭДТА для хела-

тирования ионов металлов, в т.ч., тяжелых металлов, радионуклидов; ЭДТА также способствует размягчению и разрушению водорослей и служит ингибитором окисления биологических растворов.

Извлечение пигмента производится двукратной экстракцией натрий-фосфатным буфером pH 6,5-7,5 (0,02-0,05 М), содержащим 10 мМ NaЭДТА.

Экстракция пигмента длится сутки при настаивании разрушенной биомассы водорослей в температурном режиме 20-25 °С. Для ускорения процесса экстракции рекомендуем выдерживать разрушенную и размороженную биомассу водорослей в течение 1 ч при температуре 40-50 °С. Соотношение сырье : экстрагент составляет 1 : 4.

Затем разрушенную биомассу водорослей последовательно фильтруют под низким давлением или центрифугируют при 1500-5000 g в течение 15-20 мин и получают неочищенный экстракт водорастворимых веществ, доминирующим компонентом которых является фикоэритрин.

Для очистки экстракта фикоэритрина от значительного количества хлорофилл-белковых комплексов, каротиноидов, низкомолекулярных белков и других примесей экстракт очищают и концентрируют на мембранных фильтрах. При этом пигмент концентрируется примерно в 100 раз.

Дальнейшая химическая очистка экстракта фикоэритрина состоит в осаждении пигмента 45-50 %-м водно-спиртовым или водно-ацетоновым раствором с добавлением 1 %-го хлористого натрия в течение 5-10 мин с последующим центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин. Полученный плотный осадок можно высушить естественным путем либо методом низкотемпературного распыления, или же лиофильной сушкой. Фикоэритрин имеет темный красно-малиновый цвет, его концентрация составляет 830 мг/л, он без запаха, при соединении с водой полностью растворяется, имеет оранжевую флуоресценцию. Выход красителя составляет не менее 1 г сухого порошка из 1 кг сырой массы водорослей.

Оставшаяся биомасса водорослей может быть использована для получения агара, затем на корм животным и как удобрение.

S.I. Los'

N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkivska str., 01001 Kiev, Ukraine

BIOCHEMICAL PRINCIPLES FOR PHYCOERYTHRIN PRODUCTION FROM MARINE ALGAE

Biochemical principles of the production process for obtaining phycoerythrin (a food dye) from marine alga *Gracilaria* are developed. Optimal conditions for destruction of algae and extraction of the dye (the composition of extractant, its concentration, pH, the temperature and time of treatment) are determined. General recommendations are given for creation of pilot production. The method for destruction of marine red algal biomass based on the principle of mechanical destruction of the cell wall of algae and on the freezing of the extracting agent with homogenization of algae is approved and recommended. To obtain and preliminary

purify the phycoerythrin extract the successive filtration and centrifugation of the destroyed biomass of algae and extract of phycoerythrin are advanced. The membrane filtration and deposition using the 45-50 % aqueous solution of ethyl alcohol or acetone is suggested for final purification and concentration of the extract. The suggested method for production of food dye from gracilaria allows us to obtain pure phycoerythrin of the intensive red-crimson color, which may be widely used in food and perfume industries as food supplements, dyes and also in the perfume, medical industries as fluorescent markers for diagnostics and in radiobiology.

Key words : marine algae, gracilaria, phycoerythrin, food dye, production process.

- Беляев Б.Н., Нехорошев М.В. Перспективы получения фикоэритрина при культивировании *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf (*Rhodophyta*) // Альгология. – 2002. – 12, № 4. – С. 481-490.
- Бойченко В.А., Береснева Г.П., Климов В.В. Световая адаптация и фотоингибирование фотосинтеза морского фитопланктона // Физиол. раст. – 1990. – 37, вып. 3. – С. 495-503.
- Евстигнеева И.К. Культивирование *Laurencia coronopus* J. Ag. (*Rhodophyta*) на искусственном субстрате в Черном море // Альгология. – 1993. – 3, № 2. – С. 86-92.
- Лось С.І. Фікобіліпротеїни представників синьозелених водоростей в залежності від поживного середовища // Укр. бот. журн. – 1995. – 52, № 1. – С. 87-93.
- Судьбина Е.Г., Калугина-Гутник А.А., Шнюкова Е.И. и др. Биохимическая характеристика марикультуры *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. и перспективы ее использования // Альгология. – 1994. – 4, № 2. – С. 3-14.
- Суховерхов С.В., Кадникова И.А., Аминина Н.М. Исследование пигментов из красной водоросли *Meristotheca papulosa* // Тез. докл. всерос. конф. молод. ученых (Мурманск, 23-25 апреля 2002 г.). – Мурманск, 2002. – С. 192.
- Bhat Vadiraja B., Madyastha K.M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA // Biochem. Biophys Res. Commun. – 2001. – 285, N 2. – P. 262-266.
- Micro-algae biotechnology / M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka. – Cambridge: Univ. Press, 1988. – 477 p.
- Hattori A., Crespi H.L., Katz J.J. Association and dissociation of phycocyanin and effect of deuterium substitution on the processes // Biochemistry. – 1965. – 4, N 7. – P. 1225-1238.
- Hirata Takashi, Tanaka Mikiya, Ooike Masaki et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis* // J. Appl. Phycol. – 2000. – 12, N 3-5. – P. 435-439.
- Lu, Rong-Zhao, Yu Yan-Li. Spectral changes in fluorescence of phycobilisomes in the course of dissociation // Photosynthetica (Praque). – 1984. – 18, N 2. – P. 179-183.
- Mac Coll.R., Csatorday K., Berns D.S., Traeger E. The relationship of the quaternary structure of allophycocyanin to its spectrum // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – 208, N 1. – P. 42-46.
- Perrom C., Felicini G.P., Cecere E. Photosynthesis and chromatic adaptation in *Solieria* sp. (*Rhodophyta* – *Gigartinales*) // J. Mar. Biol. Ass. UK. – 1989. – 69, N 3. – 736 p.
- Romay Cheyla, Delgado Rene, Ramirez Diadelis et al. Effect of phycocyanin extract on tumor necrosis factor- α and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin // Arzneim.-Forsch. – 2001. – 51, N 9. – P. 733-736.
- Scott E., Berns D.S. Protein-protein interaction. The phycocyanin system // Biochemistry. – 1965. – 4, N 12. – P. 2597-2606.
- Stryer Zubert, Glazer A.N., O'Vernon T. Fluorescent conjugates for analysis of molecules and cells / Pat. US, No 4859582, 1989.

Получена 21.12.07

Подписала в печать Е.И. Шнюкова

